

**ANÁLISE GENOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE FRAÇÕES E ISOLADOS
DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE)**

TAMIRES MOTA DA SILVA

RIO BRANCO

2016

**ANÁLISE GENOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE FRAÇÕES E ISOLADOS
DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE)**

TAMIRES MOTA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia da Universidade Federal do Acre, como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Ciência Inovação e Tecnologia para Amazônia.**

Orientador: Prof. Dr. Renildo de Moura Cunha

RIO BRANCO

2016

TAMIRES MOTA DA SILVA

**ANÁLISE GENOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE FRAÇÕES E ISOLADOS
DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE)**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

28/04/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renildo de Moura Cunha

Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

Prof^ª. Dra. Clarice Maia Carvalho

RIO BRANCO

2016

DEDICATÓRIA

Dedico com todo amor e carinho aos meus filhos, **Beatriz Mota Baginski** e **Miguel Mota Baginski**, por ser minha fonte de motivação e inspiração para poder superar cada dia.

A meu esposo, **Leandro Baginski**, por seu sacrifício e força nos momentos de minha ausência e por crer em minha capacidade, ainda que tenhamos passado por momentos difíceis, sempre esteve ao meu lado com seu carinho e amor.

A minha mãe e irmãos, que suas palavras sempre me deram forças para seguir adiante acreditando nos meus ideais.

Aos meus amigos, que compartilhamos conhecimentos, alegrias e tristezas e a todas as pessoas que durante esses dois anos estiveram ao meu lado me apoiando para que este trabalho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida, meu porto seguro.

Universidade pelo ambiente criativo e amigável que proporcionou.

Projeto que possibilitou que colocasse na prática a minha pesquisa.

Ao meu orientador, prof. Dr. Renildo Cunha que me proporcionou crescimento profissional e pessoal.

Ao prof. Dr. Dionatas Meneguetti, pela colaboração na realização dos testes antitumoral e por servir de inspiração na realização dessa pesquisa.

Ao prof. Dr. Valdir Alves Facundo e toda equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) pelo fornecimento dos extratos, frações e metabólitos secundários isolados.

A prof^a Clarice Carvalho, por ceder gentilmente seu Laboratório de Microbiologia para o desenvolvimento dos trabalhos com cepas e por colaborar com pesquisas relacionados à microbiologia.

Grata à todos!

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes
coisas do homem foram conquistadas do que
parecia impossível.”*

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Compostos isolados Maitansina e Tingenona.....	17
Figura 2.	Espécie <i>Maytenus guianensis</i>	24
Figura 3.	Metabólitos secundários isolados EHC de <i>Maytenus guianensis</i>	25
Figura 4.	Toxicidade das frações de <i>Maytenus guianensis</i>	34
Figura 5.	Antitoxicidade das frações de <i>Maytenus guianensis</i>	34
Figura 6.	Efeitos mutagênicos das frações de <i>Maytenus guianensis</i>	34
Figura 7.	Efeitos antimutagênicos das frações de <i>Maytenus guianensis</i>	34
Figura 8.	Metabólitos secundários Tingenina B isolado de <i>Maytenus guianensis</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tabulação dos dados dos testes de toxicidade, antitoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade.....	32
Tabela 2.	Tratamento, número total de células de <i>Allium cepa</i> analisadas no ciclo celular em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase	36
Tabela 3.	Atividade antibacteriana das Frações hexânicas da entrecasca de <i>M. guianensis</i>	41
Tabela 4.	Atividade antibacteriana de Tingenina B, isolado da entrecasca de <i>M. guianensis</i>	42
Tabela 5.	Atividade antibacteriana da Concentração Inibitória Mínima da Fração hexânica.....	43
Tabela 6.	Atividade antibacteriana da Concentração Inibitória Mínima isolado Tingenina B.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC - American Type Culture Collection
EBC - Extrato acetônico bruto da entrecasca
CIM – Concentração Inibitório Mínimo
CN - Controle negativo
CNS - Controle negativo do solvente
CP - Controle positivo
FH - Fração hexânica
FAC - Fração acetato de etila da entrecasca
FE - Fração Clorofórmica da Entrecasca
FC - Fração Clorofórmica da Entrecasca
NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute

RESUMO

Maytenus guianensis é uma espécie vegetal representante da família Celastraceae, endêmica da Amazônia brasileira, onde é conhecida por chichuá. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal, antiparasitária e anticancerígeno. Acredita-se que essa ação farmacológica pode estar relacionada à presença de terpenóides ocorrentes nesse gênero, o que justifica a realização do presente estudo que objetivou uma análise genotóxica e antibacteriana de frações e isolados de *Maytenus guianensis*. As análises genotóxica e mutagênica da fração hexânica foram realizadas pelos métodos de germinação dos meristemas, índice mitótico e micronúcleo em *Allium cepa*. Considerando os resultados dos testes, as frações FH e FC de *M. guianensis* não apresentaram efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos e a FH ainda apresentou efeito antitóxico, anticitotóxico e antimutagênico. Para investigação do potencial antibacteriano, as amostras foram submetidas a ensaios de atividade antimicrobiana utilizando a técnica de difusão em disco. As bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733, *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram crescidas a 37°C por 4-6 h sendo sua turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri, depositados sobre estes discos de papel e sobre estes 20 µL das amostras e incubados a 37 °C por 24 h. Posteriormente ao processo de incubação, foram considerados com atividade antibacteriana, as amostras que não permitiram o crescimento bacteriano ao redor do disco. Para o controle positivo foi utilizado o Clorofenicol 30mg/mL. Foi observado que a FH e o isolado Tingenina B não apresentaram efeitos satisfatório contra as cepas *E. coli* e *k. pneumoniae*, todavia ambas as drogas mostraram potencial antibacteriano contra *S. aureus* e *S. pneumoniae*. As amostras foram submetidos a novos testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), para cada uma das espécies de bactérias que apresentaram atividade satisfatória. Cada uma das amostras foi diluída a partir da concentração inicial na proporção 1:1 acrescentando 200 µL para cada diluição, totalizando 6 concentrações diferentes. A CIM foi determinada para FH contra *S. aureus* em 0,37 µg/mL com alo de inibição de 10,3 mm e para a cepa de *S. pneumoniae* CIM 5 µg/mL apresentando alo de inibição de 9,2 mm. Os testes do isolado Tingenina B contra as cepas, apresentaram uma CIM de 0,37 µg/mL com alo de inibição de 11,5 mm e 2,5 µg/mL apresentando alo de 8,5 mm respectivamente. Estes resultados mostraram que a entrecasca *M. guianensis* não possuem efeito tóxico, citotóxico e mutagênico e ainda apresentaram efeitos antitóxicos, anticitotóxicos e antimutagênico com atividade antibacteriana, sendo indicados estudos futuros para investigar o mecanismo de ação para cada atividade avaliada, visando à obtenção de um novo protótipo de fármaco ou fitoterápico como antibiótico e antitumoral que possam servir de subsídio, para novas alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: *Maytenus guianensis*, Genotoxicidade, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*

ABSTRACT

Maytenus guianensis is a species representative of the Celastraceae family, endemic in the Brazilian Amazon, which is known for chichuá. The leaves are used in folk medicine for the treatment of diseases of the gastrointestinal tract, anticancer and antiparasitic. It is believed that the pharmacological action may be related to the presence of terpenoids occurring in this genre, which justifies the completion of this study that aimed a genotoxic and antibacterial analysis of fractions and isolated from *Maytenus guianensis*. The genotoxic and mutagenic analysis of the hexane fraction were carried out by the methods of germination of meristems, mitotic index and micronucleus *Allium Cepa*. Considering the test results, the HF and CF *M. guianensis* fractions showed no toxic effects, cytotoxic and mutagenic and FH also presented antitoxic, anticitotóxico and antimutagenic effect. To investigate the antimicrobial activity, the samples were subjected to antimicrobial activity tests using the disk diffusion method. Pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733, *Escherichia coli* ATCC 10536 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 were grown at 37 ° C for 4-6 h and turbidity adjusted to 0.5 McFarland scale. The bacteria were seeded in Petri dishes deposited on these paper discs, and these envelopes 20 uL of the samples and incubated at 37 ° C for 24 h. Subsequent to the incubation process, were considered to have antibacterial activity, the samples did not allow bacterial growth around the disk. For the positive control was used the chloramphenicol 30mg / ml. It was observed that the HF and isolated Tingenina B does not have a satisfactory effect against strains of *E. coli* and *K. pneumoniae*, however, both drugs showed antimicrobial activity against *S. aureus* and *S. pneumoniae*. Samples were subjected to further testing to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for each bacteria species that showed satisfactory activity. Each sample was diluted from the initial concentration in the 1: 1 ratio by adding 200 uL for each dilution, totaling 6 different concentrations. The MIC was determined to FH against *S. aureus* of 0.37 g / ml with allo inhibition of 10.3 mm and the strain of *S. pneumoniae* MIC 5 ug / ml presenting allo inhibition of 9.2 mm. Isolated tests Tingenina B against strains showed a MIC of 0.37 g / ml with allo inhibition of 11.5 mm and 2.5 ug / ml presenting allo 8.5 mm respectively. These results showed that the bast *M. guianensis* have no toxic effect, cytotoxic and mutagenic and still had antitoxic, anticitotóxicos and antimutagenic effects with antibacterial activity, and indicated future studies to investigate the mechanism of action for each assessed activity in order to obtain a new drug prototype or herbal medicine as antitumor antibiotic and that can serve as a basis for new therapeutic alternatives.

Keywords: *Maytenus guianensis*, genotoxicity, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 FAMÍLIA CELASTRACEAE.....	17
2.2 GÊNERO <i>MAYTENUS SP</i>.....	18
2.2.1. Potencial Antitumoral.....	20
2.2.2. Potencial Antibacteriano	21
2.2.3. Espécie <i>Maytenus guianensis</i>.....	23
3. OBEJETIVOS.....	27
4. CAPÍTULO 1. Análises Citotóxica e Mutagênica DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>MAYTENUS GUIANENSIS</i>.....	29
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1.1 Coleta de Material Botânico e Preparo das frações.....	30
4.1.2 Análise Genotóxica em <i>Allium cepa</i>.....	30
4.1.3 Análise Estatística.....	31
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.3 CONCLUSÃO.....	37
5. CAPÍTULO 2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FRAÇÕES E ISOLADOS DE <i>MAYTENUS GUIANENSIS</i>.....	38
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1.1. Preparo do extrato, frações e isolados.....	39
5.1.2. Determinação da atividade antibacteriana.....	40
5.1.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	40
5.1.4. Análise Estatística.....	40
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.3 CONCLUSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO GERAL.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução humana, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para sua alimentação e tratamento de suas enfermidades, dessa forma, o conhecimento e domínio sobre esses vegetais foi sendo adquirido por muitos povos (FERREIRA; PINTO, 2010).

Até os XVIII e XIX, as plantas e seus extratos foram utilizados como medicamentos pela maioria das terapêuticas, fossem elas tradicionais, de cunho popular, exotérico ou não, com o avanço de novas tecnologias foi possível isolar e/ou sintetizar substâncias ativas de origem natural, como por exemplo, a morfina (1803), a quinina (1819) e a atropina (1831) (NASCIMENTO, 2006; SOUZA, 2013). E foi possível observar, em alguns casos, que esses recursos diminuía riscos de toxicidade e aumentavam a eficácia do tratamento (GUERRA; NODARI, 2010; SOUZA, 2013).

Até meados do século XX, as plantas medicinais constituíam a base da terapia medicamentosa, foi quando a terapia com síntese química teve seu início no final do século XIX, apresentando um grande avanço, porém devido às expectativas exageradas, os vegetais passaram novamente a ser foco das pesquisas farmacológicas (FLOGLIO et al., 2006).

A exploração desses recursos se faz em vários setores da ciência, com aplicação industrial e além de fornecer substâncias ativas em seu estado natural, algumas espécies também podem apresentar compostos passíveis de modificações químicas (KINGHORN; BALANDRIN, 1993; SOUZA, 2013).

Esses compostos que são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais (SHAKERI; BOSKABADY, 2015), mas ainda se tem um grande potencial etnofarmacológico, visto que em todo mundo apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal (FLOGLIO et al., 2006).

Os fármacos produzidos através de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, podendo ser como antibacteriano, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores, anticancerígenos, entre outros (BRANDÃO et al., 2010). Esse fato pode ser observado tendo em vista que 60% dos medicamentos anticancerígenos atualmente disponíveis na terapêutica apresentam alguma relação com produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007; BRASIL, 2013).

No mundo, há aproximadamente 290 mil espécies de plantas e destas menos de 216 mil são catalogadas (MORA et al., 2011). O Brasil está entre os países com maior biodiversidade de plantas do planeta, com cerca de 20% da flora do mundial (MMA, 1998; GIULITTE, 2005; MENEGUETTI et al., 2014b), sendo que a maioria está concentrado na

região norte do país (NOLDIN et al., 2006), sendo um região estratégica para estudos com plantas medicinais.

Entre as famílias botânicas com potencial para a produção de fármacos, recebe destaque a Celastraceae com cerca de 1.200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (CARVALHO, 2011), dentre estas a espécie *Maytenus guianensis*, que é descrita com diversas atividades farmacológicas pelas populações tradicionais, sendo que as atividades dessa espécie já demonstraram efeitos antiparasitários, antimutagênico e antígeno tóxico (MENEGUETTI et al., 2014a; MENEGUETTI et al., 2014b; MENEGUETTI et al., 2015a; MENEGUETTI et al., 2015b). Sendo necessária a realização de estudos com diferentes frações, com o intuito de potencializar os efeitos já encontrados em outros estudos e também aumentar a segurança etnofarmacológica em relação à utilização desta espécie. Indispensáveis também são as pesquisas para averiguar a atividade antibacteriana, levando em consideração que são quase inexistentes dados científicos que comprovem a mesma.

A fim de aumentar a segurança da medicina tradicional e possibilitar o futuro desenvolvimento de um fármaco ou até mesmo um fitoterápico, o governo brasileiro definiu a política nacional de inclusão de plantas medicinais como forma de tratamento complementar (CARVALHO et al., 2011), e isso fez com que nos últimos anos tenha ocorrido um expressivo número de interesse por plantas medicinais, esse fato pode ser evidenciado pelo aumento no número de publicações nesta linha de pesquisa em revistas indexadas (CALIXTO, 2000).

Essa classe também se encontra em expansão em função de necessitar o menor aporte financeiro e curto espaço de tempo para sua comercialização (NIERO, 2010; BRASIL, 2013). Em contra partida, acontecem alguns problemas peculiares em decorrência do controle de qualidade, isso acontece devido à natureza da planta, formadas por misturas complexas de compostos que podem variar consideravelmente dependendo dos fatores ambientais e genéticos. Além disso, os princípios ativos responsáveis pelos efeitos terapêuticos são muitas vezes desconhecidos o que impede o nível de controle de qualidade (ARGENTA et al., 2011; BRASIL, 2013).

Devido a esses fatores, houve um avanço no desenvolvimento de técnicas de isolamentos de substâncias puras de produtos naturais, principalmente as técnicas de separação cromatográfica e os métodos de elucidação estrutural possibilitaram isolar e identificar os princípios ativos dos produtos naturais usados na medicina popular (SILVIA et al., 2003; BRASIL, 2013). Além do uso terapêutico, havia também um grande interesse

na obtenção de corantes, polímeros, fibras, colas, óleos, aromatizantes e perfumes (CROTEAU et al., 2000; BRASIL, 2013), dessa forma, os produtos naturais continuaram estimulando o desenvolvimento da química orgânica, em busca de melhores características farmacológicas e farmacocinéticas destes produtos (HARVEY, 2008; BRASIL, 2013).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. FAMÍLIA CELASTRACEAE:

Na Amazônia existem inúmeras plantas que possuem atividade medicinal (OSAKADA, 2009), entre elas, a família Celastraceae, onde as primeiras pesquisas químicas realizadas ocorreram no início do século XIX, a partir do isolamento da maitansina (Figura 1A), um alcalóide proveniente da espécie *Maytenus* sp. com atividade antitumoral (KUPCHAN et al., 1972; BRASIL, 2013). Os crescentes estudos foram intensificados com a descoberta da ação antitumoral apresentada pela tingenona (Figura 1B) de natureza triterpênica pentacíclica (MARINI-BETTOLO, 1974; BRASIL, 2013).

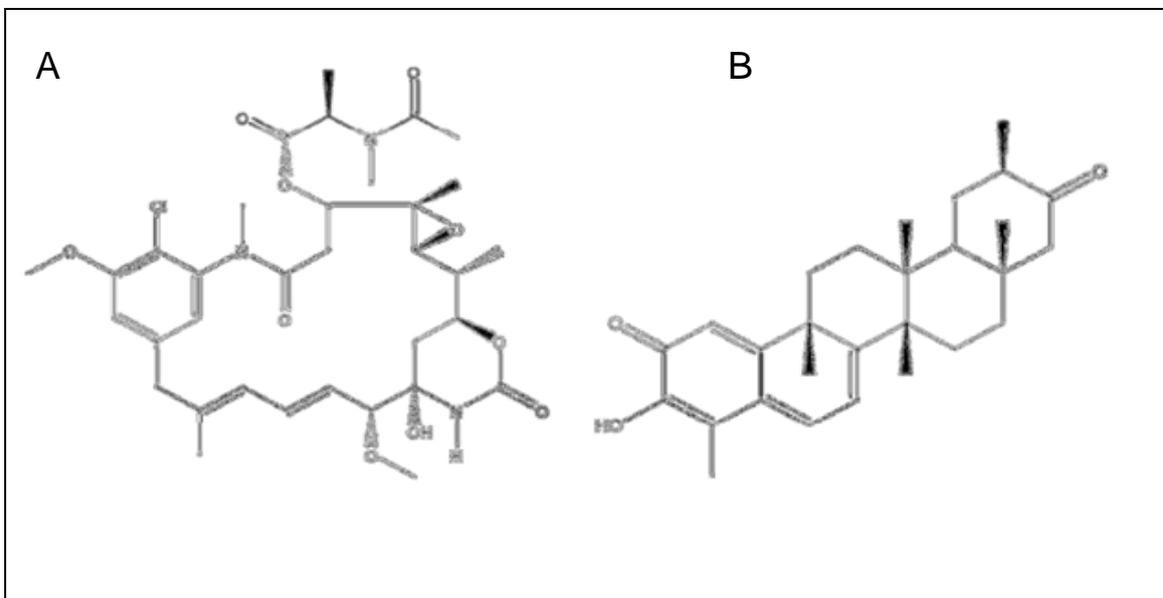


Figura 1: Compostos isolados A) Maitansina B) Tingenona **Fonte:** MARINI-BETTOLO, 1974; BRASIL, 2013

A família Celastraceae, que são antecidas pelas seguintes classificações taxonômicas: Grupo das Angiospermas, subclasse: Rosidae, ordem: Celastrales. Os modelos de classificação mais recentes utilizam, além da semelhança morfológica, a repetição de determinados genes em um grupo de espécies. Com o auxílio de técnicas de biologia molecular, foi possível agrupar espécies a família Celastraceae e organizar as subfamílias (SIMMONS, 2004; SOUZA, 2013).

Nas análises taxonômicas dessas espécies observa-se um padrão sistemático de distribuição de alguns metabólitos (DHARMASSREE, 1982; SOUZA, 2013). A família Celastraceae, tem mostrado de grande interesse devido sua atividade farmacológica, tais como: anti-reumática, antibacteriana, antitumoral, ação curativa em feridas de pele, ação antiucrogênica, cicatrizante e antiinflamatória, inseticida e imunossupressora

(FONSECA et al., 2007). Em isolamentos de substâncias a partir de extratos de folhas, caules e raízes em espécies da família Celastraceae é comum encontrar compostos que são ricos em esteroidais e triterpenóides, como triterpenos pentacíclicos, friedelânicos e quinonoídicos, sesquiterpenos, secfriedelanos e esteróides (MAIA; LIMA; VASCONCELLOS, 2009). Também já foram isolados derivados agarofurânicos, catequinas, proantocianidinas, glicosídeos, flavanóides glicosilados e alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (FONSECA et al., 2007).

A família Celastraceae, está distribuída em todo mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais como China, África, Paraguai, Brasil, Argentina, Uruguai e ainda o Sul da Arábia Saudita (ALAJMI; ALAM, 2014). No Brasil, é representada por quatro gêneros: *Austroplenckia*, *Franhoferia*, *Maytenus* e *Salacia* (DE OLIVEIRA et al., 2006; MENEGUETTI, 2015), entre estes, recebe destaque o gênero *Maytenus* sendo o maior dessa família possuindo cerca de 225 espécies (NEGRI; POSSAMAI; NNAKASHIMA, 2009; ALMEIDA et al., 2010; MENEGUETTI, 2015)

2.2. Gênero *Maytenus*

O nome *Maytenus* é derivado da palavra “Maytén”, usado pela primeira vez pelo povo “Mapuche” (Homem da terra) do Chile, de acordo com o folclore sul americano, uma série de usos medicinais tem sido atribuída a várias espécies de *Maytenus*, este gênero é amplamente utilizado na medicina tradicional principalmente para o tratamento de doenças gástricas (NIERO et al., 2011; BRASIL, 2013).

O gênero *Maytenus* está inserido dentro da família Celastraceae, que está distribuída por todo território brasileiro, ocorrendo na região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (JOFFILY; VIEIRA, 2005; LOMBARDI; GROppo; BIRAL, 2015; MENEGUETTI, 2015).

Esse gênero é de interesse visto que várias espécies são utilizadas na medicina tradicional, entre elas podemos destacar algumas espécies:

- *Maytenus aquifolium* conhecida popularmente como espinheira santa, apresenta ação antiúlcera e analgésico (SOUZA – FORMIGONI et al., 1991; COELHO; DI

STASI; VILEGAS, 2003; TIBETI et al., 2007; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2013; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus ebenifolia* usada para tratamento de reumatismo, hemorróidas, artrite, resfriados, disenteria, erupções da pele, inchaço dos rins, bronquite e infecções femininas, relaxante muscular, analgésicos, anticancerígeno, afrodisíaco e tônico estimulante (ITOKAWA et al., 1993; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; REVILLA, 2002; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus ilicifolia* ação farmacológica como antiúlcera, diurético, relaxante, antitumoral, digestivo, abortivo, anticoncepcional, tratamento de feridas, antiséptico, antiasmático, analgésico, anticancerígeno, antiinflamatórios e acelerador de menstruação (ARENAS; AZORERO, 1977; MONTANARI; CARVALHO; DOLDER, 1988; CORDEIRO; VILEGAS; LANÇAS, 1999; MONTANARI; BENVILACQUA, 2002; JORGE et al., 2004; VELLOSA et al., 2006; PESSUTO et al., 2009; SANTOS – OLIVEIRA; COULAUDCUNHA; COLAÇO, 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus guianensis* ação farmacológica contra rumatismo, hemorróidas, artrite, resfriados, disenteria, erupções da pele, inchaço dos rins, bronquite e infecções femininas, relaxante muscular, analgésicos, antiinflamatório, antiparasitário, anticancerígeno, afrodisíaco e tônico estimulante (FILHO, 2011; REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; FONSECA et al., 2007; PRATA; MENDONÇA, 2009; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus obtusifolia* apresenta ação contra antiúlcera, ansiolíticos, antitumoral e antiinflamatório (MOTA et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus rígida* ação farmacológica Analgésico, antiinfecioso e antiinflamatório (MOTA et al., 2008; NIERO ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus robusta* ação contra antiúlcera (NIERO et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus salicifolia* ação como antialérgico e alívio de coceiras (VALLADÃO et al., 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; MENEGUETTI, 2015);

- *Maytenus truncata* ação antiúlcera, antiinflamatório e contra doenças do útero (FONSECA et al., 1997; SALAZAR et al., 2001; SILVA et al., 2005; FONSECA et al., 2007; NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; MENEGUETTI, 2015)

2.2.1 Potencial Antitumoral

Os tumores podem ser desencadeados devidos causas internas ou externas, sendo que ambas estão inter-relacionadas, dentre as causas internas estão hereditariedade e envelhecimento, os fatores ambientais são responsáveis de 80 a 90% dos casos de câncer, sendo que os mais frequentes estão relacionados ao tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares, hábitos sexuais, infecção viral, medicamentos, radiação solar e fatores ocupacionais, dessa forma, o surgimento de câncer irão depender da intensidade e duração da exposição das células a esses fatores de riscos (INCA, 2012; SOUZA, 2013).

Muitos agentes mutagênicos atuam sobre as células, por meio de metabólitos ativos ou através de geração de radicais livres, que conseqüentemente, é sugerido que a sua suplementação poderia melhorar os efeitos prejudiciais de processos oxidativos no organismo vivo, ambos os dados clínicos e experimentais foram fornecidos para provar esse processo (FERGUNSON et al., 2005; BRUNI et al., 2006).

As implicações dos efeitos genotóxicos de complexas misturas e produtos químicos incluem a iniciação de carcinogenicidade, a geração de distorções hereditárias através de mutações em células germinativas, e teratogenicidade (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; RAYMUNDO et al., 2012). Um aumento na genotoxicidade é acompanhado a um aumento do risco de câncer (HAGMAR et al., 1998; RAYMUNDO et al., 2012).

Para realização do tratamento de alguns tipos de câncer, tem-se empregado o uso de compostos de origem vegetal, entre estes estão os alcaloides vimblastina e a vincristina, extraídas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, cuja utilização clínica se aplica no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos (SOUZA, 2012).

Na busca de novos fármacos anticancerígenos de origem vegetal, é comum associar técnicas fitoquímicas de isolamento a *screenings* biológicos automatizados e uma das primeiras etapas para esse tipo de investigação é a avaliação *in vitro* da atividade citotóxica dos extratos de vegetais (SOUZA, 2012).

A citotoxicidade de espécies da família Celastraceae já foi relatada por alguns estudos, entre os gêneros, o que se destaca frente essas atividades é o gênero *Maytenus* sp.,

sendo que algumas espécies apresentaram atividade citotóxica em ensaios com linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT29) e carcinoma de células pulmonares humanas (NCIH460) (MONKS et al., 2002; SOUZA, 2012). A espécie *Maytenus ovatus*, forneceu, através de estudo fitoquímico, a substância maitansina, com elevado potencial citotóxico, todavia sem valor clínico devido a sua capacidade *in vivo* de agredir células normais, além das cancerígenas (CASSADY et al., 2004; SOUZA, 2012).

Em investigações com novas substâncias com potencial anticancerígeno, foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* frente às linhagens MDA-MB-435 MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon-humano) e SF-295 (sistema nervoso central) com as frações hexânica e acetato de etila da casca da espécie *Salacia crassifolia* (Celastraceae), e foi possível observar citotoxicidade significativa (DE OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA, 2012).

Em uma pesquisa realizada com *M. ilicifolia* e seus efeitos sobre sementes de alface e meristemas de cebola foram observado que o extrato teve efeitos alelopático sobre sementes de alface e efeitos citotóxicos sobre sementes de alface e cebola (SOUZA, 2006).

Em outro estudo realizado com a espécie *Maytenus krukovii*, foi possível observar que o extrato da casca é capaz de induzir uma diminuição evidente na mutagenicidade (BRUNI et al., 2006). Outro estudo realizado com a espécie *Maytenus senegalensis*, os isolados foram testados contra células de linfoma do rato L 5178Y e mostrou citotoxicidade e inibiu completamente o crescimento celular (OKAYE et al., 2014).

Essas atividades antitumoral do gênero *Maytenus sp.* foi relacionado devido a presença de taninos e derivados da catequina (PEREIRA et al., 1999; SOUZA, 2012), encontraram-se, também, outros metabólitos como fenilalquilaminas e flavonóides (SPIVEY et al., 2002; SOUZA, 2012) e alguns compostos triterpenicos comumente isolados desse gênero, ursólico e ácido oleanólico, que já foi comprovado que inibem à iniciação do tumor (LIU, 1995).

Essas investigações fitoquímicas de espécies representantes da família Celastraceae muito contribuem para o isolamento de substâncias com potencial terapêutico no tratamento do câncer. (SOUZA, 2013)

2.2.2 Potencial Antibacteriano

A descoberta dos antimicrobianos trouxe benefícios para a humanidade, diversas patologias que eram consideradas incuráveis puderam ser tratadas com o uso deste medicamentos, dessa forma, em 1927, o cientista Alemão Gerhard Domagk observou que uma tinta vermelha chamada Prontosil apresentara atividade germicida, a partir de então se conheceu a atividade antimicrobiana dos derivados da sulfa (World Health Organization-WHO, 2000; SOUZA, 2012). Em 1928, Alexander Fleming descobriu que os fungos podem produzir substâncias com potencial de antibióticos, essas substâncias ficaram conhecidas depois como penicilina, logo após, foi descoberta a estreptomicina, quinolonas, antifúngicos, antiparasitários e antivirais, drogas conhecidas coletivamente como antimicrobianas e que salvaram milhões de vidas (World Health Organization-WHO, 2000; SOUZA, 2012).

Contudo, o maior problema enfrentado com uso de antibióticos é a seleção natural de microrganismo resistente, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode promover o aparecimento de bactérias resistentes, propiciando que genes de resistência sejam disseminados (SPINDLER, 2009), embora possa ser minimizado com o uso racional, se torna inevitável, dessa forma há uma necessidade de novos antibióticos exigindo uma demanda constante (WEBER; COURVALIN, 2005; SOUZA, 2012).

Buscando a identificação de novas substâncias com atividade antimicrobiana, extratos e compostos obtidos a partir de folhas de *Maytenus* foram submetidos a testes contra microorganismos.

Testes realizados com extrato bruto e fração acetato de etila de *Maytenus rígida* apresentaram efeitos antibacterianos (SANTOS et al., 2011).

Outros estudos realizado com o mesmo gênero também apresentaram efeitos antibacterianos, como foi o caso da *Maytenus ilicifolia* que apresentou atividade antibacteriana contra as gram positivas *Streptococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* (LIMA et al., 1969).

Novos estudos realizados com extratos de *M. robusta* mostram o seu potencial tanto para bactérias como para fungos, o extrato clorofórmio das folhas apresentou alta inibição frente a *S. aureus* (100% ± 8%), *C. albicans* (100% ± 6%) e *B. cereus* (75% ± 1%) (SOUZA, 2012).

Essas atividades antibacterianas podem ser explicadas devido estudos comprovarem que os taninos gálicos podem inibir o crescimento de bactérias pela modificação da permeabilidade da parede celular (ANNUK et al., 1999).

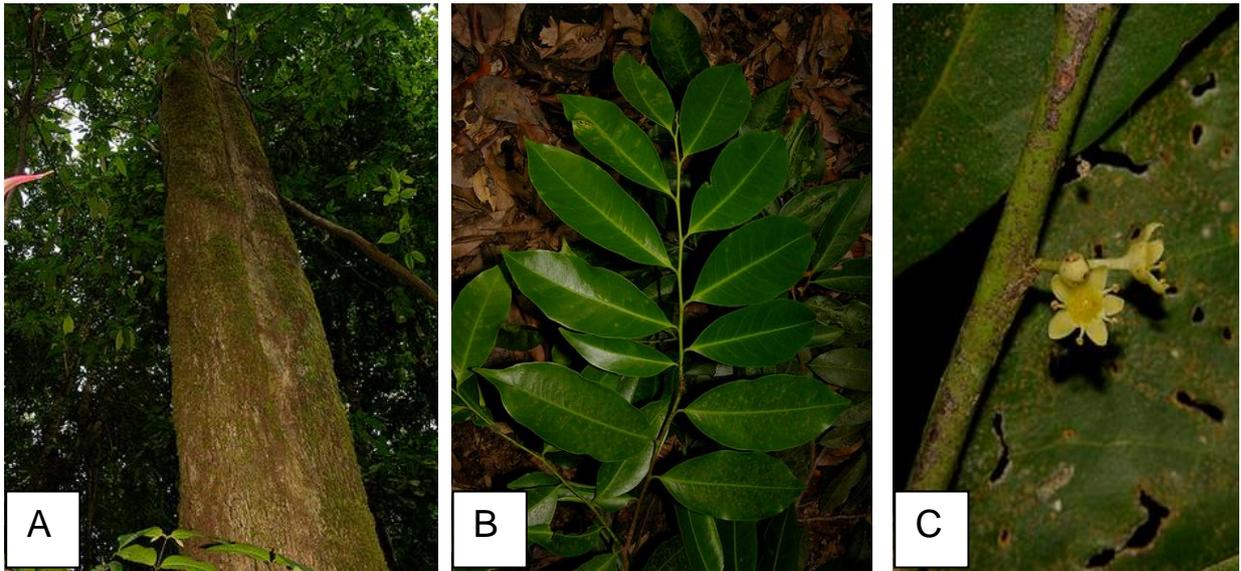
As friedelinas e o friedelanos, compostos comumente isolados do gênero *Maytenus*, possuem atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *S. aureus* e *E. coli* (SINGH; DUBEY, 2001).

Em um estudo realizado com cultura da raiz da espécie *Maytenus senegalensis*, mostrou que a mesma apresentou atividade antibacteriana, ainda que três vezes inferior quando comparado com os extratos obtidos a partir de plantas cultivadas, mostrando o potencial antibacteriano e um recurso para as espécies que não podem ser exploradas (LINDSEY et al., 2006).

Os avanços na identificação e compreensão dos novos mecanismos de ação dos antimicrobianos mostram que diversos fatores podem ser responsáveis pela ação de determinada substância, contribuindo de maneira diferenciada para a atividade antimicrobiana (CATÃO, 2007). Esses avanços se mostram importantes devido o medicamento possui quase sempre apenas um princípio ativo que é responsável pelo seu efeito farmacológico, enquanto o extrato vegetal possui vários compostos ativos e inativos que são responsáveis pelo seu efeito e que atuam em alvos farmacológicos diversos (FERREIRA; PINTO, 2010).

2.2.3 *Maytenus guianensis*

A espécie *M. guianensis* (Figura 2) é uma árvore endêmica da Amazônia, conhecida popularmente como chichuá, xixuá, chuchauase, chucchu huashu, chuchuasi e chuchasha (DUCKE; VASQUEZ, 1994; REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003; MENEGUETTI, 2015), suas folhas apresentam de 10 – 20 cm de comprimento e 3 – 4 cm de largura, veia central proeminente em ambas as faces; ápice acuminado com pecíolo de 4 mm de largura, cálice colorido com dentes decíduos e pétalas obovadas de cor branca (REVILLA, 2001; 2002; BAY – HURTADO, 2015), suas raízes e caule são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antirreumático, antidiarreico e como cosmético contra erupções cutâneas e prevenção de câncer de pele (BORRAS, 2003; BAY-HURTADO, 2015).



Todo gênero *Maytenus* é caracterizado por uma variedade quase única de fitoquímicos, principalmente triterpenos, flavonóides, taninos condensados e alcalóides sesquiterpenos (CORSINO et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2004; BRUNI et al., 2006). A espécie *M. guianensis* não faz exceção a isso, em investigação fitoquímica da casca da espécie, foi possível isolar e identificar nove triterpenos, quatro friedelanos: Friedenila (Figura 3A), Friedelinol (Figura 3B), 16 β -hidroxifriedelina (figura 3C), 29-hidroxifriedelina (Figura 3D); Tingenona (Figura 3E); 22 β -hidroxitingenona (Figura 3F); Mistura de β -amirina (Figura 3G); α -amirina (Figura 3H); β -sitosterol (Figura 3I); Sesquiterpene (Figura 3J).

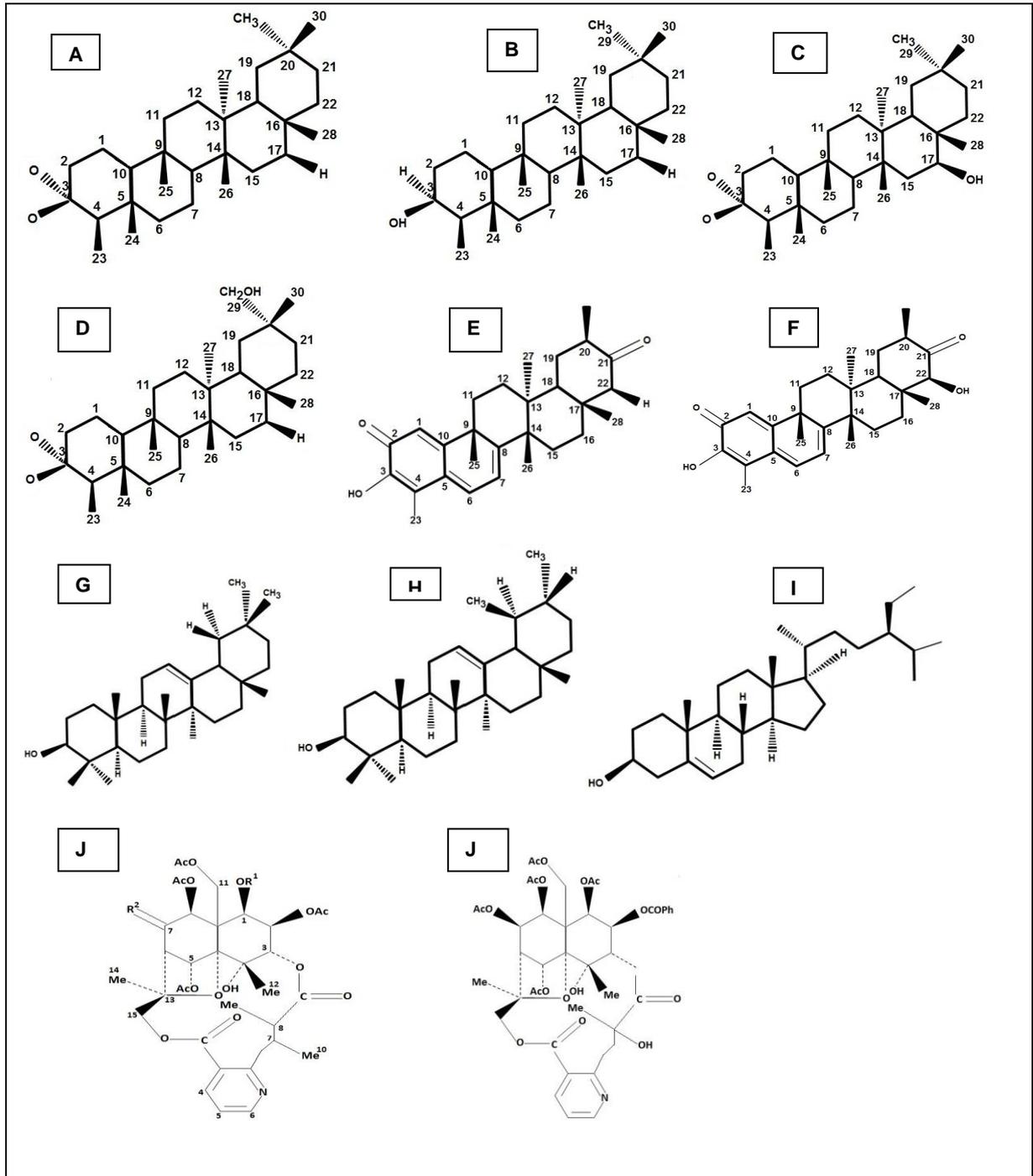


Figura 3: Metabólitos secundários isolados do EHC de *M. guianensis*.

Acredita-se que a função fisiológica dos triterpenos em plantas é uma defesa química contra patógenos e herbívoros, e conseqüentemente, existe uma possibilidade de ser usada contra certos agentes patógenos humanos e animais (AVARENGA; FERRO, 2005). Os friedelanos são os mais frequentes triterpenos isolados dessa família (CORSINO, 1991; AVARENGA; FERRO, 2005).

Dentre os triterpenos ocorrentes no gênero *Maytenus*, recebem destaque os dímeros com atividade antimicrobiana, lupânicos com atividade antiinflamatória, friedelânicos com atividade antiulcerogênica e antimicrobiana e sesquiterpenos com atividade citotóxica, antitumoral e antiparasitária atuando como anti-helmintico e tripanocida (SHIROTA et al., 1994; GONZÁLEZ et al., 1996; DUARTE et al., 2002; REYES et al., 2006; MENAREJÓN et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; MORITA et al., 2008; DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008; MENEGUETTI, 2015). Embora poucos compostos orgânicos isolados tornem-se medicamentos clinicamente eficazes, essas moléculas únicas podem servir de modelo para elaboração de análogos mais eficientes (NEWMAN; CRAGG, 2007; BRASIL, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise genotóxica e antibacteriana de frações e isolados de *Maytenus guianensis* klotzsch ex reissek (Celastraceae) Amazônico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade de frações e isolados de *M. guianensis*;
- Investigar a atividade antibacteriana da fração hexânica e isolado de *M. guianensis*;

4. CAPÍTULO I

ANÁLISE CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Maytenus guianensis*

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Coleta do Material Botânico e Preparo das Frações

As amostras de *M. guianensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) (Latitude 02°53'S, Longitude 59°58'W). Sendo encaminhada para o laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

A identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata nº 188.485.

As entrecasas do caule foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50 °C por 48 h, sendo em seguida realizada raspagem para retirada da entrecasca visando aumentar a superfície de contato, obtendo-se 1,9 kg, estas que foram extraídas três vezes com acetona (3L x 3) em temperatura ambiente, durante 72 h, em cada ciclo. Os extratos foram filtrados em papel filtro e o solvente rotaevaporado (rotaevaporador TE-211, Tecnal) a 80 °C onde se obteve o Extrato Acetônico Bruto da Entrecasca (EBC) em quantidade de 200 g.

As frações foram preparados a partir de 50 g do EBC, sendo fracionado em cromatografia de coluna com sílica gel, por meio de eluição com hexano, acetato de etila, etanol e clorofórmio até a exaustão, dando origem a Fração Hexânica da Entrecasca (FH), Fração Acetato de Etila da Entrecasca (FAC), Fração Etanólica da Entrecasca (FE) e Fração Clorofórmica da Entrecasca (FC).

4.1.2 Análise Genotóxica em *Allium Cepa*

Para a realização do experimento utilizou a espécie *A. cepa* (conhecida popularmente como cebola de cabeça), devido estudos enfatizarem a importância e a utilização de testes com vegetais na avaliação de risco de genotoxicidade, apesar das diferenças entre os metabólitos de plantas e animais há também similaridades, e que ativação de pró – mutágenos possui alta relevância (BAY – HURTADO, 2015). As cebolas foram selecionadas de tamanho uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis.

Em cada concentração e controles foram utilizados 10 bulbos de *A. cepa*, sendo estes submersos para germinação em 50 mL dos extratos em estudo a 24 °C, durante 72 horas.

Para os testes foram utilizados todas as frações na Concentração de 100 µg/mL = 5 mg da Droga dissolvido em 500 µL do solvente etanol e os seguintes controles: Controle negativo (CN): contendo apenas H₂O mineral, Controle negativo do Solvente (CNS): contendo H₂O mineral adicionado de 1% 500 µL de Etanol e Controle positivo (CP): contendo 800 mg/L de paracetamol comercial + 500 µL de Etanol, descrita como citotóxica e mutagênica (BESSEMS et al., 1995; STURBELLE et al., 2008; DUSMAN et al., 2012).

Já para os testes anticitotóxicos e antimutagênicos foram utilizadas as mesmas concentrações das frações descritas acima, adicionado do CP.

A análise citotóxica em *A. cepa* foi realizada com base na germinação dos meristemas (FISKESJO, 1986). As raízes foram medidas com 72 horas, após o início da germinação. De cada bulbo de *A. cepa* foram medidas as três maiores raízes, totalizando 30 raízes por tratamento. A medição foi realizada com régua escolar simples graduada em cm.

As análises mutagênicas e de índice mitótico ocorreram em torno de 72 horas após o início do teste, os meristemas foram coletados com 0,1 a 2,5 cm de comprimento, lavados em água destilada, seguida de hidrólise com HCL 1N por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, sendo os tubos resfriados em água corrente. Após nova lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram realizados esfregaços em duas lâminas por bulbo (totalizando 20 lâminas por tratamento), postas em seguida sob gelo seco por um minuto para retirada da lamínula e aguardado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as mesmas foram coradas conforme Meneguetti et al. (2012), utilizando o kit Panótico Rápido composto de três recipientes: primeiro triarilmetano a 0,1%, segundo xantenos a 0,1% e terceiro 51 iazinhas a 0,1%, sendo as lâminas submersas 10 vezes em cada recipiente com submersões de 1 segundo de duração na sequência descrita acima (POLETTTO et al., 2011; FÃO et al., 2012; SILVA et al., 2012; OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013).

Posteriormente as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foram contadas mil células e quantificado a quantidade de micronúcleos e o percentual de células em interfase e mitose.

4.1.3 Análise estatística

Utilizou-se o software Graphad Prism 5.0 sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste Tukey, para os testes de toxicidade e mutagenicidade sendo considerado significativo a partir de $P < 0,05$.

Para o calculo de Índice Mitótico aplicou-se a seguinte equação: (Número Total de Células em Mitose ÷ Número Total de Células × 100), sendo em seguida aplicado o teste quiquadrado, sendo considerado significativo a partir de $P < 0,05$.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos por meio das análises toxicológicas, antitoxicológicas, mutagênicas e antimutagênicas das frações de *M. guianensis* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Tabulação dos dados dos testes de toxicidade, antitoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade. (Concentrações em mg/mL)

Espécimes	Toxicidade						Antitoxicidade						
	(<i>A. cepa</i>)	CN	CNS	FH	FE	FAC	FC	CN	CNS	CP	FH	FE	FAC
1	1,8	1,1	0,5	0,4	0,2	0,9	1,8	1,1	0,2	0,6	0,2	0,1	0,4
	1,6	1,1	0,5	0,5	0,2	0,6	1,6	1,1	0,2	0,5	0,2	0	0,4
	1,5	1	0,4	0,5	0,2	0,5	1,5	1	0,1	0,5	0	0	0,1
2	1,4	1,4	0,9	0,6	0,4	0,8	1,4	1,4	0,3	0,8	0,1	0,2	0,6
	1,5	1,1	0,8	0,2	0,3	0,5	1,5	1,1	0,1	0,5	0,1	0,2	0,5
	1,2	0,9	0,5	0,2	0,3	0,5	1,2	0,9	0,1	0,5	0,1	0	0,4
3	1,5	0,8	1,2	0,3	0,6	0,9	1,5	0,8	0,4	1	0,3	0,3	0,5
	1,5	0,9	0,9	0,3	0,6	0,8	1,5	0,9	0,1	1	0,1	0,1	0,3
	1,2	1,1	0,5	0,3	0,3	0,8	1,2	1,1	0	0,9	0,1	0,1	0,3
4	1,4	0,8	1,4	0,3	0,5	0,5	1,4	0,8	0,1	0,6	0,2	0,1	0,5
	1,8	0,7	1,1	0,2	0,2	0,4	1,8	0,7	0,1	0,5	0,1	0,1	0,2
	2	0,7	1	0,2	0,1	0,4	2	0,7	0	0,3	0,1	0	0,2
5	1,8	0,5	1	0,5	0,4	1,1	1,8	0,5	0,1	0,9	0,3	0,4	0,3
	2,2	0,6	1	0,4	0,1	0,8	2,2	0,6	0	0,4	0,2	0,2	0,1
	1,4	0,8	0,9	0,4	0,1	0,7	1,4	0,8	0	0,4	0,2	0,2	0,1
6	1,2	0,5	1,4	0,8	0,6	0,8	1,2	0,5	0,3	0,6	0,3	0,1	0,4
	1,4	0,6	0,8	0,5	0,3	0,8	1,4	0,6	0,3	0,6	0,2	0,1	0,4
	1,5	0,6	0,8	0,4	0,2	0,7	1,5	0,6	0,1	0,5	0,2	0	0,3
7	1	0,6	1,2	0,9	0,4	0,5	1	0,6	0,1	0,9	0,2	0,1	0,7
	0,9	0,8	0,9	0,8	0,1	0,5	0,9	0,8	0,1	0,9	0,2	0	0,5
	0,8	0,9	0,6	0,5	0,1	0,4	0,8	0,9	0	0,7	0,1	0	0,4
8	0,9	0,8	1,1	0,6	0,4	1	0,9	0,8	0,2	1,1	0,1	0,2	0,6
	1,1	1,1	1	0,5	0,2	0,8	1,1	1,1	0,1	1	0	0,1	0,5
	0,9	1	1	0,5	0,1	0,5	0,9	1	0,1	1	0	0,1	0,5
9	0,9	0,5	0,9	0,6	0,3	1,1	0,9	0,5	0,1	1,2	0,1	0,1	0,3
	0,8	0,4	0,9	0,6	0,3	0,5	0,8	0,4	0,1	1	0,1	0,1	0,2

	0,5	0,4	0,7	0,5	0,2	0,4	0,5	0,4	0	0,6	0,1	0,1	0,2
10	1	0,6	1,4	0,7	0,3	1,3	1	0,6	0,2	1,1	0,2	0,2	0,5
	1,2	0,8	1,2	0,4	0,1	1,3	1,2	0,8	0	0,8	0,2	0	0,4
	1	0,8	1,1	0,3	0,1	1	1	0,8	0	0,8	0,1	0	0,2
Média	1,3	0,8	0,92	0,46	0,27	0,73	1,3	0,8	0,12	0,74	0,15	0,11	0,37
Mutagenicidade							Antimutagenicidade						
	CN	CNS	FH	FE	FAC	FC	CN	CNS	CP	FH	FE	FAC	FC
1	1	3	4	6	11	7	1	3	8	8	9	13	14
	2	2	5	5	9	5	2	2	12	7	11	15	11
2	1	2	2	5	9	3	1	2	5	4	13	11	10
	1	5	2	3	11	4	1	5	9	6	13	10	12
3	0	4	5	8	10	3	0	4	14	2	13	16	13
	2	3	3	8	7	3	2	3	10	3	14	18	16
4	1	2	4	5	13	5	1	2	16	6	10	15	8
	2	4	6	6	6	8	2	4	12	6	16	14	10
5	1	3	5	3	6	4	1	3	9	5	9	15	7
	0	3	4	7	8	4	0	3	9	6	8	11	9
6	0	3	4	9	7	5	0	3	9	8	8	9	7
	0	4	2	10	7	6	0	4	14	4	9	10	7
7	0	6	2	11	7	4	0	6	13	7	7	14	13
	1	2	5	11	5	3	1	2	14	3	11	19	14
8	2	3	8	8	6	2	2	3	9	4	14	12	15
	2	4	1	5	8	3	2	4	7	4	14	13	15
9	1	4	6	4	6	5	1	4	16	6	15	11	16
	1	5	7	4	9	8	1	5	14	3	11	15	10
10	2	6	3	5	11	3	2	6	13	5	9	14	10
	0	3	1	3	10	4	0	3	15	5	10	17	9
Média	1	3,5	3,9	6,3	8,3	4,4	1	3,5	11,4	5,1	11,2	13,6	11,3

CN: Controle negativo; **CNS:** Controle negativo do solvente; **FH:** Fração hexânica; **FE:** Fração etanólica; **FAC:** Fração acetato de etila da entrecasca; **FC:** Fração clorofórmica

Os dados mostram que as frações FE e FAC de *M. guianensis* apresentaram toxicidade quando comparado ao CNS.

As frações FH e FC não apresentaram efeitos tóxicos (Figura 4) e ainda apresentaram ação antitoxicidade ($P < 0,001$), contra os efeitos ocasionado pelo paracetamol na concentração de 800 mg/L conforme o observado no CP (Figura 5).

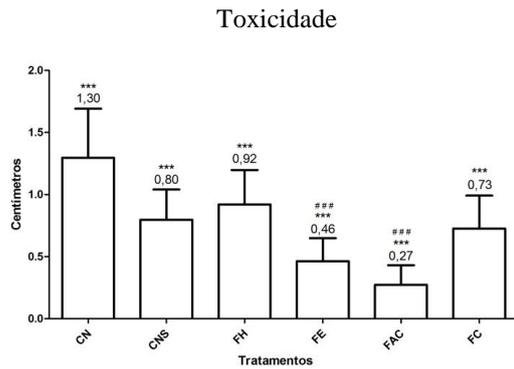


Figura 4: Toxicidade das frações de *M. guianensis*

Significativo em relação ao CN *** ($P < 0,001$). Teste Anova e Tukey. Significativo em relação ao CNS ### ($P < 0,001$). Teste Anova e Tukey.

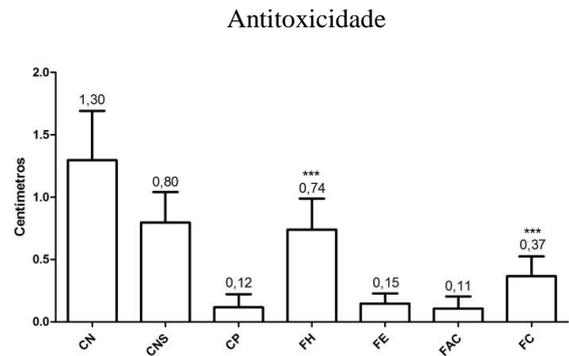


Figura 5: Antitoxicidade das frações de *M. guianensis*

Significativo em relação ao CP *** ($P < 0,001$). Teste Anova e Tukey

Resultados semelhantes foram encontrados por Meneguetti et al. (2014b), onde nas concentrações de 3,85 mg/mL e 38,5 mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis*, apresentaram ação antitoxicológica, contra os efeitos ocasionados pelo paracetamol na concentração de 800 mg/L mesma concentração utilizada no CP do presente estudo.

Os efeitos não tóxicos de espécies do gênero *Maytenus*, também foi observado em outro estudo realizado com *M. peduncularis*, *M. procumbens*, *M. senegalensis* e *M. undata*, contra linhagens de células Vero (AHMED et al., 2013).

Os tratamentos que apresentaram ações mutagênicas foram às frações FE e FAC ($P < 0,001$) (Figura 6). Nos testes de antimutagenicidade os resultados foram semelhantes aos testes antitoxicidade, tendo ação significativa FH ($P < 0,001$) (Figura 7).

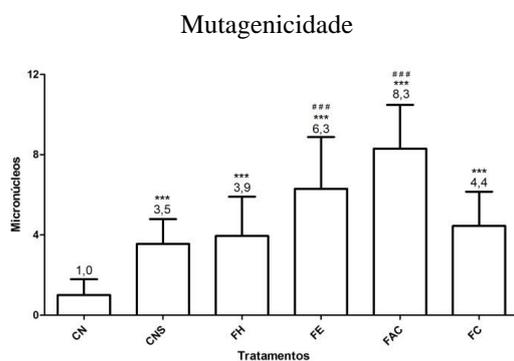


Figura 6: Efeitos mutagênicos das frações de *M. guianensis*

Significativo em relação ao CN *** ($P < 0,001$). Teste Anova e Tukey Significativo em relação ao CNS ### ($P < 0,001$). Teste Anova e Tukey

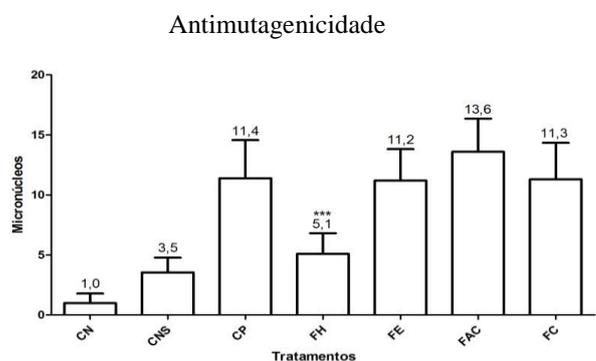


Figura 7: Efeitos antimutagênicos das frações de *M. guianensis*

Significativo em relação ao CP *** ($P < 0,001$). Teste Anova e Tukey

Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado com extrato aquoso de *M. guianensis* em *A. cepa*, onde foi possível observar que nas concentrações de 3,85 mg/mL e 38,5 mg/mL não apresentou ação mutagênica, e ainda atuam como antimutagênico (MENEGUETTI et al., 2014b), esses mesmos extrato, nessas mesmas concentrações não apresentou efeitos genotóxicos e ainda possui ação antígenotóxica em camundongos tratados de forma aguda (MENEGUETTI et al., 2015a).

Outro estudo realizado com extrato etanólico bruto de *M. rígida in vivo*, por meio do teste de micronúcleos, não foi observado mutagenicidade (TAVARES, 2013), esses achados também foram observados com extratos hidroalcoólicos de *M. robusta* que não apresentou nenhum efeito clastogênico nas células da medula óssea de ratos (RAYMUNDO et al., 2012). Efeitos ainda mais promissores foram observados *in vitro* com extrato de *M. ilicifolia*, onde foi evidenciada uma redução da mutagênese induzida pela epigalocatequina-3-galato no teste de AMES (KRUL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

Acredita-se que os efeitos antimutagenicos e antígenotóxicos, ocorrentes no gênero *Maytenus*, estão relacionados diretamente com a ocorrência de triterpenos, visto que grupos isolados de triterpenos que foram testados *in vitro*, apresentou uma atividade citotóxica significativa contra células 4T1 (SOUSA et al., 2014), esse mesmo grupo exibem citotoxicidade frente algumas linhagens celulares de vários tipos de câncer (CHATURVEDI et al., 2008; SIDDIQUE; SALEEM, 2011; TAVARES, 2013), vindo de encontro com o presente estudo, visto que diversos triterpenos já foram isolados de FH de *M. guianensis* (FACUNDO et al., 2015).

Os resultados de citotoxicidade e anticitotoxicidade dos diferentes tratamentos sobre o ciclo de *A. cepa* podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamento e número total de células de *A. cepa* analisadas no ciclo celular em interfase e mitose

Tratamento	Número de Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Mitose	
CN	20.000	15.982	4.018	20,09
CNS	20.000	17.142	2.858	14,29***
FH	20.000	16.805	3.195	15,97***
FE	20.000	17.614	2.386	11,93*** ##
FAC	20.000	18.453	1.547	7,73*** ###
FC	20.000	17.610	2.390	11,95*** ##
CP	20.000	19.008	992	4,96
CP+ FH	20.000	17.213	2.787	13,93 ***
CP+ FE	20.000	18.908	1.092	5,46
CP+ FAC	20.000	19.076	924	4,62
CP+ FC	20.000	17.643	2.357	11,78 ***

Significativo em relação ao CN *(P<0,05), ** (P<0,01) e *** (P<0,001). Teste Qui-Quadrado

Significativo em relação ao CNS # (P<0,05), ## (P<0,01) e ### (P<0,001). Teste Qui-Quadrado

CN: Controle negativo; **CNS:** Controle negativo do solvente; **FH:** Fração hexânica; **FE:** Fração etanólica; **FAC:** Fração acetato de etila da entrecasca; **FC:** Fração clorofórmica; **CP:** Controle positivo;

A fração FH não apresentou atividade citotóxica, quando comparado ao CNS, e ainda teve uma ação anticitotóxica quando comparado com o CP (P<0,001). Já a FC apresentou ação citotóxica e anticitotóxica, semelhante aos dados encontrados por Meneguetti (2014b), onde na concentração de 77 mg/mL demonstrou ter ação citotóxica e anticitotóxica na presença do parecetamol.

Os efeitos anticitotóxicos podem estar relacionado à presença de triterpenos como friedelina e o friedelol que apresentam atividade citotóxica sobre células de linhagens tumorais *in vitro* (OKABE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009), esses grupos também já foram encontrados em FC de *M. guianensis* (FACUNDO et al., 2015). Em outros estudos já foi comprovado que as principais atividades biológicas atribuídas aos derivados desses sesquiterpenos estão: atividade antitumoral e inseticida (TAKAISHI et al., 1993; SOUZA, 2013)

As frações FE, FAC apresentaram ação citotóxica e não tiveram efeito anticitotóxico, quando comparado aos CNS e CP respectivamente. Esses efeitos foram observados em outro estudo com meristemas de *A. cepa*, onde utilizou frações de *M. guianensis*, sendo possível observar que a exposição por 48 horas, nas concentrações de 50 mg/mL; 100 mg/mL; 200 mg/mL das frações de *M. guianensis* foi evidenciada a capacidade antiproliferativa da célula, porém nesse estudo não foi observado ações clastogênica e aneugênica (BAY – HURTADO, 2015), diferentemente de outro estudo onde na concentração de 192 mg/mL do extrato aquoso da mesma espécie, demonstrou o

aumento significativo de micronúcleos e algumas pontes anafásicas (MENEGUETI et al., 2014b), os mesmos que também foram observados na FE e FAC, porém não foi quantificado a quantidade de pontes anafásicas.

Em estudos realizados por Meneguetti (2015a), com extrato aquosa de *M. guianensis* em um ensaio cometa com camundongos foi possível observar que as concentrações de 77 mg/mL e 192 mg/mL apresentaram ação mutagênica em relação ao CN. Esse fato pode ser explicado devido muitos compostos naturais encontrados em várias plantas consumidas pelas populações tradicionais são potenciais agentes cancerígenos ou promotores de tumores e deve ser evitado seu uso por longos períodos e em concentrações elevadas (BODE; DONG, 2014; MENEGUETTI et al., 2015a), visto que as concentrações de 77mg/mL e 192mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis* são 20 e 50 vezes mais concentradas que o uso popular da mesma (CAMPAROTO et al., 2002; MENEGUETTI et al., 2014b; MENEGUETTI et al., 2015a)

4.3 CONCLUSÃO:

O presente estudo demonstrou que as frações FH e FC de *M. guianensis* não apresentaram efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos e a FH apresenta ainda efeitos Antitóxicos, anticitotóxicos e antimutagênico. Porém ainda são indicados estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, a fim de melhorar a compreensão dos efeitos fisiológicos das frações e de seus isolados, sendo averiguados os possíveis efeitos sinérgicos, ou até potencialização dos resultados com os isolados.

5. CAPÍTULO II

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FRAÇÕES E ISOLADOS DE *Maytenus*
*guianensis***

5.1. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Preparo do extrato, Frações e Isolados

As amostras de *M. guianensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) (Latitude 02°53'S, Longitude 59°58'W). Sendo encaminhada para o laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

A identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata nº 188.485.

As entrecasas do caule e folhas, foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50°C por 48 h, sendo em seguida realizada raspagem para retirada da entrecasca visando aumentar a superfície de contato, obtendo-se 1,9 kg, estas que foram extraídas três vezes com acetona (3L x 3) em temperatura ambiente, durante 72h, em cada ciclo. Os extratos foram filtrados em papel filtro e o solvente rotaevaporado (rotaevaporador TE-211, Tecnal) a 80°C onde se obteve o Extrato Acetônico Bruto da Entrecasca e Folha.

As frações foram preparadas a partir de 50g de cada extrato bruto, sendo fracionado em cromatografia de coluna com sílica gel, por meio de eluição com hexano, acetato de etila, etanol e clorofórmio até a exaustão, dando origem a Fração Hexânica da Entrecasca (FH) e Folha (FHF), Fração Acetato de Etila da Entrecasca (FAC) e Folha (FACF), Fração Etanólica da Entrecasca (FE) e Folha (FEF), Fração Clorofórmica da Entrecasca (FC) e Folha (FCF).

O isolamento dos metabólitos secundários, só foi realizado na FH, visto que foi a fração que apresentou resultados satisfatórios (dados mostrados nos resultados e discussões). A partir da FH foi realizada cromatografia em coluna de gel de sílica, efetuando a eluição com n-hexano, e posteriormente, com n-hexano: CHCl₃ misturados com polaridade crescente. As estruturas de todos os compostos isolados foram elucidadas pela análise de seus dados espectrais (IR, MS, ¹H e ¹³C, incluindo COSY, HMQC, HMBC e NOESY) e por comparação com os dados da literatura (FACUNDO et al., 2015).

A partir da FH foram isolados quatro metabólitos secundários: Friedelan-3-ona, Tingenina B (22β-hidroxi-tingenona), Friedelinol (3-β-Hidroxifriedelano) e 29-hidroxifriedelina, todos já isolados anteriormente na espécie *M. guianensis* (FACUNDO et al., 2015; MENEGUETTI; FACUNDO, 2015).

5.1.2 Determinação da Atividade Antibacteriana

As amostras obtidas foram submetidas ao ensaio de atividade antimicrobiana utilizando a técnica de difusão em disco segundo o NCCLS (2003). Para tanto, as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733, *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram crescidas a 37°C por 4-6 h sendo sua turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. As bactérias então foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Muller-Hinton, depositados sobre estes discos de papel e sobre estes 20 µL das amostras e incubados a 37 °C por 24 h. Posteriormente ao processo de incubação, foram considerados com atividade antibacteriana, as amostras que não permitiram o crescimento bacteriano ao redor do disco. Para o controle positivo foi utilizado o Clorofenicol com concentração de 30mg. Os halos de inibição produzidos foram medidos com ajuda de paquímetro digital.

5.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

Os extratos vegetais que apresentaram atividade antibacteriana foram submetidos a novos ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para cada uma das espécies de bactérias que os mesmos mostraram eficácia. A CIM é a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano. Neste método, a CIM é determinada com uma sequência decrescente de concentrações da amostra em um meio nutriente (líquido), que é inoculada com a concentração padronizada do microrganismo em teste (ZACCHINO; GUPTA, 2007). Cada uma das amostras foi diluída a partir da concentração inicial na proporção 1:1 exspectro de concentração, acrescentando 200 µL para cada diluição, totalizando 6 concentrações diferentes, os ensaios foram realizados em difusão em disco e em triplicata. No final do tempo de incubação (24 horas), os halos inibitórios foram mensurados com ajuda do ImageJ.

5.1.4 Análises Estatísticas

Os dados apresentados são a média das triplicatas dos halos de inibição dos experimentos e comparado com os dados do Clorofenicol.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as frações foram testadas contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Sendo que a única que apresentou resultado satisfatório foi a FH, tendo atividade contra *S. aureus* e *S. pneumoniae* (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade biológica da fração hexânica de *M. guianensis*

Bactérias	Controle Clorofenicol 30µg/mL	Amostra FH 20 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,6 mm	12 mm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15 mm	20,4 mm

mm: milímetro

Os valores dos testes antibacterianos mostraram uma maior atividade da FH para as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae*, apresentando como halo de inibição 12,0 mm e 20,4 mm respectivamente, quando comparado com a droga controle o Clorofenicol, que mesmo sendo realizado em concentrações maiores de 30 mg, apresentou como halo de inibição de 18,6 mm e 15 mm respectivamente. Esses resultados discordam com os encontrados por Estevam et al. (2009), onde o extrato hexânico da entrecasca de *M. rigida* não apresentou atividade antibacteriana tanto para Gram positivo *S. aureus* como para Gram negativo *E. coli*. Esta variação em relação à presença de atividade antibacteriana pode não estar relacionada somente a característica da planta, uma vez que diversas espécies apresentam diferentes princípios ativos, mas também pode estar relacionada às características das cepas testas (SANTOS et al., 2011). Estes resultados estão de acordo com os realizados por Lindsey et al. (2006), em que cultura de raiz de *M. senegalensis* apresentou atividade antibacteriana contra Gram positiva *S. aureus* e *Bacillus subtilis*.

A FH não apresentou resultados satisfatórios contra *klebsiella pneumoneae* e *E. coli*, do grupo das bactérias gram negativas, isso pode ser explicado devido sua parede apresentar uma dupla membrana, que apesar de todas as bactérias terem uma membrana interna, as bactérias gram-negativas têm uma única membrana externa evitando com que certos fármacos e antibióticos penetrem na célula (SERAFIM, 2013).

Entre os metabólitos secundários isolados, o que apresentou melhor atividade antibacteriana foi tingenina B (Figura 8), conforme pode ser observado na (Tabela 4).

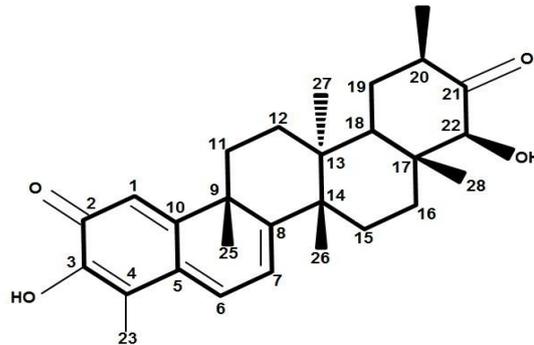


Figura 8: Isolado Tingenina B de *M. guianensis*

Tabela 4: Atividade biológica de composto isolado de <i>M. guianensis</i>		
Bactérias	Controle Clorofenicol 30mg	Amostra Tingenina B 20 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,6 mm	15,6 mm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15 mm	14,4 mm

mm: milímetro

O isolado tingenina B, não apresentou atividade biológica frente às cepas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, resultados similares foram encontrados por Lima et. al (2016), em que isolados Tingenina B e Tingenona de *M. guianensis* não apresentaram efeitos satisfatórios contra as cepas *E. coli*. Esses dados não estão de acordo com os encontrados por Rodrigues (2011), em que ensaios antibacterianos realizados com Tigenona apresentaram 100% de inibição *Escherichia coli*. Outro estudo realizado com isolados de triterpenos, ácido ursólico, ácido betulínico e um diterpeno fenólico, o carnosol, contra bactérias produtoras de β -lactâmicos, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, os compostos apresentaram ação antibacteriana considerada moderada, os resultados são considerados promissores, visto que estas bactérias são frequentemente resistentes a vários antibióticos (DALMARCO et al., 2005). Mesmo o isolado tingenina B não ter apresentado resultados satisfatório contra *E. coli* e *K. pneumoniae*, outros resultados mostram o grande potencial do grupo triterpenos para atividades antibacterianas.

Entretanto, o isolado tingenina B apresentou resultados promissores frente às cepas de *S. aureus* e *S. pneumoniae*, quando comparado ao controle positivo. Resultados

semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2016), em que isolados de tigenina B e tingenona, na concentração de 20 µg/mL, apresentaram resultados satisfatórios frente as cepas *S. aureus* com halo de inibição de 18 mm. Em outra pesquisa realizada com isolado tingenona, o mesmo apresentou melhor potencial antibacteriano quando comparada a Azitromicina, um antibiótico que suprime a biossíntese de proteína e retarda o crescimento bacteriano, com CIM de 0,12µg/mL e 4,0 µg/mL. Isso pode ser explicado devido essas substâncias isoladas apresentarem um melhor fator de inibição de *S. aureus* (RODRIGUES et al., 2012).

Outro estudo realizado com sesquiterpenos, o laurinterol, isolaurinterol, alolaurinterol e cupalaurenol, apresentaram um amplo espectro de atividades contra bactérias gram-positivas, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina, *S. pneumoniae* resistente à penicilina (MACHADO et al., 2010), resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2016), em que mistura dos isolados de tigenina B e tingenona (na concentração de 20 µg/mL), apresentaram resultados satisfatórios frente à *S. aureus* resistente a meticilina com halo de inibição de 12 mm. Esses resultados estão de acordo com os apresentados nesse trabalho, em que isolado tigenina B apresentou atividade contra a bactéria *S. pneumoniae* e *S. aureus*, mostrando novamente o potencial do grupo triterpenos.

A determinação da atividade antibacteriana possibilitou a avaliação e a determinação do CIM com base na mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento (Tabelas 5 e 6).

Amostra/ CIM	Microorganismos testados/Halo de inibição em mm		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
FH	10µg/mL	12,2mm	8,3mm
	5µg/mL	12,7mm	9,2mm
	2,5µg/mL	12,8mm	-
	1,75µg/mL	12,1mm	-
	0,37µg/mL	10,3mm	-
	0,18µg/mL	-	-

µg: microgramas
mm: milímetro

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima do isolado Tingenina B

Amostra CIM	Microorganismos testados/Halo de inibição em mm		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Tingenina B	10µg/mL	12,6mm	9,4mm
	5µg/mL	19,9mm	9,5mm
	2,5µg/mL	12,7mm	8,5mm
	1,75µg/mL	12,2mm	-
	0,37µg/mL	11,5mm	-
	0,18µg/mL	-	-

µg: microgramas
mm: milímetro

A FH apresentou uma CIM de 0,37 µg/mL e 5 µg/mL para *S. aureus* e *S. pneumoniae* respectivamente. Este resultado está de acordo com o encontrado por Dalmarco et al. (2006), em que a fração hexânica de *M. ilicifolia*, apresentou ação frente às cepas de *S. aureus*, apresentando uma CIM de 0,39 mg/mL. Segundo Virtuoso et al. (2015), isso pode ser explicado devido os triterpenos presentes nas plantas estarem concentrados geralmente nas frações mais apolares, nesse caso na fração hexânica, e essas substâncias são conhecidas por diversas atividades biológicas, principalmente antibacteriana.

Todavia, quando comparado a FH com o isolado tingenina B, esse último mostra uma melhor atividade tanto para *S. aureus* como para *S. pneumoniae* apresentando CIM de 0,37 µg/mL e 2,5 µg/mL, com halos de inibição de 11,5 mm e 8,5 mm respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os encontrado por León et al. (2010), que realizou um estudo a partir da raiz de *Maytenus blephorodes* e mostrou que os compostos isolados (zeylasterone e demethylzeylasterone, dois 6-oxofenólico triterpeno), apresentaram melhor atividade contra *S. aureus*.

Resultados semelhante foi observado por Mokoka (2013), em que isolados das folhas de *Maytenus untada* (sensibilidade a 3-oxo-11α ácido-hydroxyolean-12 eno-30-óico e 3,11-ácido-dihydroxyolean-12 eno-30-óico. Friedelan -3 β -ol e 3-oxo-11α ácido-methoxyolean-12 eno-30-óico) apresentaram efeitos contra todos os microorganismos testados *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, todavia *S. aureus* foi o que apresentou menor sensibilidade a todos os testes, apresentando a CIM superior a 250 µg/mL, a concentração mais alta testada.

Outro estudo realizado com extratos da casca de *Maytenus chuchuhuasca*, onde foi possível observar a inibição da polimerização de tubulina-proteína que está associada à

sustentação celular, ou seja, ao “citoesqueleto” desempenhando atividade anti-mitótica. Os compostos responsáveis por essa inibição foram os triterpenos quinonametídeos tingenona, 22 β -hidroxitingenona, pristimerina e celastrol (MORITA, 2008; TRINDADE, 2013). Mostrando o grande potencial desse composto isolado não somente para efeitos antibacterianos como também para outras atividades antimicrobianas e parasitárias.

5.3. CONCLUSÃO:

Foi investigado, o potencial efeito antibacteriano da fração hexânica e o isolado tingenina B de *M. guianensis*. Considerando os resultados dos testes, nota-se que a FH e o isolado tingenina B não apresentaram atividade biológica frente as cepas *E. coli* e *k. pneumoniae*, contudo ambas as drogas mostraram potencial antibacteriano contra *S. aureus* e *S. pneumoniae*.

Os resultados observados nesse trabalho, possibilitam que estudos futuros possam ser realizados com bactérias patógenas, visando à melhor exploração dos potenciais antibacterianos e na obtenção de um novo protótipo de fármaco ou fitoterápico como antibiótico que possam servir de subsídio, visando novas alternativas terapêuticas.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O teste com *A. cepa* mostraram que a espécie *M. guianensis* não apresenta efeitos tóxico, citotóxico e mutagênico e ainda apresenta efeitos antitóxicos, anticitotóxicos e antimutagênico. Porém, ainda são indicados estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, a fim de melhorar a compreensão dos efeitos fisiológicos das frações e de seus isolados, sendo averiguados os possíveis efeitos sinérgicos, ou até potencialização dos resultados com os isolados.

Na investigação antibacteriana detectou-se que a FH e o isolado Tingenina B não apresentaram efeitos satisfatórios contra as cepas *E. coli* e *k. pneumoniae*, todavia ambas as drogas mostraram potencial antibacteriano contra *S. aureus* e *S. pneumoniae*. Quando comparado a FH e a Tingenina B, a mesma apresentou melhor potencial antibacteriano contra as cepas testado.

Foi possível observar que a FH possui potencial antibacteriano e não apresenta toxicidade para o organismo, apresentando ainda uma ação anticitotóxica. O que leva a crer no potencial desse composto para um novo protótipo de fármaco ou fitoterápico como antibiótico e antitumoral que possam servir de subsídio, para novas alternativas terapêuticas, todavia, estudos futuros ainda são indicados para investigar o mecanismo de ação para cada atividade avaliada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALAJMI, M.F.; ALAM, P. Anti – inflammatory activity and quantitative analysis of different extracts of *Maytenus obscura* (A. Rich) Cuf. by high performance thin layer chromatography method. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p.152 – 157, 2014.

ANNUK H, HIRMO S.; TÜRI E.; MIKELSAAR M.; ARAK E.; WADSTROMT. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol Lett**, v.172; p. 41-45, 1999.

AHMED, A.S.; McGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Evolution of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four *Maytenus* species used in Southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. **BioMed Central**, p. 1-15, 2013.

BAY-HURTADO, F.; LIMA, R.A; AZEVEDO, M.S; FACUNDO, V.A. Avaliação das atividades genotóxica e antioxidante da periderme do caule de chichuá (*Maytenus guianensis* Klotzsch) **Scientina Plena**. v. 11, 2015.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33; n. 6; p.1359-69, 2010.

BRASIL, D.F.B. **Estudo fitoquímico e análise gastroprotetora dos principais constituintes das cascas e da raízes de *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae)**. Itajaí, 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

BRUNI, R.; ROSSI, D.; MUZZOLI, M.; ROMAGNOLI, C.; PAGANETTO, G.; BESCO, E.; CHOQUECILLO, F.; PERALTA, K.; LORA, W.S.; SACCHETTI, G. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia**, v.77; p.538-545, 2006.

CARVALHO, A.C.B.; PERFEITO, J.B.S.; SILVA, L.V.C.; RAMALHO, L.S.; MARQUES, R.F.O.; SILVERIO, O. Regulation of Herbal Medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, 2011.

CARVALHO, A.C.B. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Brasília, DF, 2011.318 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; **Phytother**. v. 14, 2000.

CAMPAROTO, M.L.; TEXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S., VICENTINI, V.P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bayhينيا condicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genet. Mol. Biol**. v.25; p.85-89, 2002.

CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana e de feitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, p.9-14, 2010.

DALMARCA, J.B.; DALMARCO, E.M.; PIZZOLATTI, M.G.; Terpenos isolados de *Rosmarinus officinalis* L. com atividade antibacteriana frente a microorganismos produtores de β - lactamases de espectro estendido (ESBLs). **J. Ethnopharmacology**. 2005.

DALMARCO, E.M.; GUIMARÃES, C.L.; GUEDES, A.; CALDERARI, M.T. Análise da atividade antibacteriana (in vitro) de plantas da flora brasileira utilizados pela medicina popular. [antibacterial effects (in vitro) of brazilian plants used by popular medicine]. **Revista Ciências da Saúde. Florianópolis**. v. 25; p. 128-136, 2006.

ESTEVAM, C.S.; CAVALCANTI, A.M.; CAMBUI, E.V.F.; NETO ARAÚJO, V.; LEOPOLDO, P.T.G.; FERNANDES, R.P.M.; ARAUJO, B.S.; PORFÍRIO, Z.; ANA, A.E. G.S.; Perfil fitoquímico e ensaios microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19; p. 299-303, 2009

FACUNDO, V.A.; MENEGUETTI, D.U.O.; MILITÃO, J.L.S.T.; LIMA, R.A.; BAY-HURTADO, F.; CASSEB, A.A.; TEXEIRA, L.F.; SILVA, I.C.; SILVA, G.V.J; LACERDA, V.J; Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**. p. 270 – 273, 2015.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A.G.; A Fitoterapia no Mundo Atual. **Química Nova**. v. 33, 2010.

FLOGIO, M.A.; QUEIROGA, C.L ; SOUZA, I.M . O; RODRIGUES, R.A.F; Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um modelo Multidisciplinar. **MultiCiência**. 2006.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiucrogênica de extrato do decocto. **Química Nova**, v. 30, 2007.

GIULIETTE, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. **Biodiversity and Conservation of Plants in Brasil**. **Conservation Biology**, v.19; p. 632-639, 2005.

LEÓN, L.; LÓPEZ, M.R.; MOUJIR, L.; Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharoides*, *Staphylococcus aureus*. **Microbiological research**, v. 165; p. 617-626, 2010.

LINDSEY, K.L.; MATU, P.T.; STADEN, J.V.; Antibacterial activity of extracts from in vitro grown *Maytenus senegalensis* root cultures. **South African Journal of Botany**, p.310-312, 2006.

LIMA, O.G.; COELHO, J.S.B; WEIGERT, E.; D'ALBUQUERQUE, I.L; SOUZA, M.A.M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. **Rev Inst Antibioticos**, 9:17-25, 1969.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, 49:57–68, 1995,

MACHADO, F.L.S.; KAISER, C.R.; COSTA, S.S.; GESTINARI, L.M.; SOARES, A.R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 441-452, 2010.

MAIA; B.L.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C.; **Avaliação da atividade hemolítica, coagulante e antiagregante plaquetária do extrato seco da casca de *Maytenus guianensis***. 61º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência-SBPC. Manaus, Amazonas, 2009.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTULUZZI, R.L.C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remanescente de floresta Ombrófila Mista Altomantana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.12, p. 380-397, 2010.

MENEGUETTI, D.U.O; CUNHA, R.M.; LIMA, R. A.; OLIVEIRA, F.A.S.; MEDEIROS, D.S.S.; PASSARINI, G.M.; MEDEIROS, P.S.M.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A.; Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. 2014 a.

MENEGUETTI, D.U.O; LIMA, R.A.; SILVA, J.B; SILVA, R.P.; PAGOTTO, R.C; FACUNDO, V.A.; Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, p. 301-309, 2014 b.

MENEGUETTI, D.U.O; **Análise Genotóxica e Parasitológica de Extratos e Substâncias Isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) Amazônico**. Porto Velho, 2015b. 183p. Tese (Doutorado em Biologia Experimental) - Universidade Federal de Rondônia.

MENEGUETTI, D.U.O; LIMA, R.A.; SILVA, F.C; SILVA; PASSARINI, G.M.; FACUNDO, J.B.; PAGOTTO, R.C.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A.; Acute genotoxicity analysis in vivo of the aqueous extract of *Maytenus guyanensis* Amazonian chichuá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. p. 164-169, 2015a.

MENEGUETTI, D.U.O; FACUNDO, V.A.; Análise genotóxica e antiparasitária de extratos de substância isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) Amazônico. Resumo de tese e dissertação. **Rev. Pan – Amaz Saúde**, 2015c.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica. **Ministério do Meio Ambiente** (MMA), Brasília. 1998

MOKOKA, T.A.; MCGAW, L.J; MDEE, L.K.; BAGLA, V.P.; IWALEWA, E.O.; ELOFF, J.N.; Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus untada* (Celastraceae). **Biomedcentral**, 2013.

MORA, C.; TITTERSON, D.P.; ADL, S.; SIMPSON, A.G.B.; WORN, B.; How many species are there on earth and in ocean? PLoS **BIOLOGY**, v.9, 2011.

NAKAGAWA H.; TAKAISHI Y.; FUJIMOTO Y.; DUQUE C.; GARZON C.; SATO M.; OKAMOTO M.; OSHIKAWA T.; AHMED S.U. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. **J Nat Prod**, 004;67:1919–1924.

NCCLS. **Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada**. 8 ed. NCCLS, Pensilvania, Estados Unidos da América. 58 p. 2003.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL FILHO, V. GÊNERO *Calaphyllum*: importância clínica e farmacológica **Química Nova**, v.29, p.549-54, 2006.

OKAYE, F.B.C.; DEBBAB, A.; WRAY, V.; ESIMONE, C.O.; OSADEBE, P.O.; PROKSCH, P.; A phenyldilactone, bisnorsesquiterpene, and cytotoxic phenolics from *Maytenus senegalensis* leaves. **Tetrahedron Letters**, v.55, p. 3756-3760, 2014.

OLIVEIRA, R.S.; CUNHA, S.C.; COLAÇO, W.; Revisão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Ressek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognesia**, v. 19, p.650-659, 2009.

RAYMUNDO, T.M.; FAVILLA, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; MAISTRO, E.L.; Genotoxicity of the Medicinal plant *Maytenus Robusta* in mammalian cells *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, v. 11(3), p. 2847-2854, 2012.

RODRIGUES, V.G.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; SILVA, F.C.; GÓES, J.V.; TAKAHASHI, J.A.; PIMENTA, L.P.S; evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenos Isolated from *Maytenus imbricata*. **Química Nova**, v.35, 2012.

RODRIGUES, V.G.; **Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata*. ex. Reissek**. Belo Horizonte 2011. Dissertação (Mestrado Química Orgânica) - Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTOS, V.L.; SOUZA, M.F.V; BATISTA, L.M; SILVA, B.A; LIMA, M.S.; SOUSA, A.M.F; BARBOSA, F.C; CATÃO, R.M.R; Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart.(Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13 p. 68 – 72, 2011.

SANTOS, V.A.F.F.M. **Aspectos metabolômico, biológico e proteômico de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* (Celastraceae)**. Araraquara, 260p, 2010. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Paulista.

SERAFIM, M.L.R.C.; **Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras provenientes do aterro controlado da cidade de campos dos goytacazes- rj** Campos de Goytacazes 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SHAKERI, F.; BOSKABADY, M. H.; A Review of the Relaxat Effect of Varius Medicianl Plants on Tracheal Smooth muscle, their possible mechanism and potency. **Journal Ethopharmacology**, 2015.

SOUZA, J.R.; PINHEIRO, J.A.; RIBEIRO, E. F.; SOUZA, E.; MAIA, G.S.; A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus guianensis*. **Phytochemistry**; v. 25. 1986.

SOUSA, G.F.; SOARES, D.C.F.; MEXILHÃO, W.N.; POMPEU, N.F.E.; SILVA, G.D.F.; FILHO, S.A.V.; DUARTE, L.P.; Pentacyclic Triterpenes from Branches of *Maytenus robusta* and *in vitro* Cytotoxic Property Against 4T1 Cancer Cells. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25 p.1338-1345, 2014.

SOUZA, S. M.; **Estudo fitoquímico e atividade citotóxica de extratos e frações de *Austroplenckia populnea* Reissek (Celastraceae)** Ouro Preto 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.

SOUZA, G. F.; **Estudo fitoquímico do extrato hexânico e da atividade biológica de constituintes das folhas de *Maytenus robusta* (Celastraceae)** Belo Horizonte, 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.

SPINDLER, A.; **Caracterização cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de efluente hospitalar não tratado: resistência a beta-lactâmicos e presença de integrons.** Porto Alegre, 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SINGH B.; DUBEY, M.M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz *in vivo* and *in vitro*: antimicrobial screening. **Phytother Res** 15: 231-234, 2001.

TAVARES, A.V.; **Avaliação *in vivo* do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato etanólico da entrecasca do caule de *Maytenus rígida* Mart através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos.** Campina Grande, 2013. (Monografia Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba.

TRINDADE, I. C. **Estudo químico de extratos e frações de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Resseik e de seus fungos endofíticos.** Ouro Preto, 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J.F.G.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** p. 137-142, Abr./Jun. 2005.

ZACCHINO, A.S.; GUPTA, M.P. **Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos.** Rosario: Corpus Editorial y Distribuidora, p. 85-99, 2007.